

学校编码: 10384
学号: 20620091151291

分类号_____密级_____
UDC_____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

地衣芽孢杆菌 Fosmid 文库构建及絮凝基因
探索

Construction of the Fosmid library of *Bacillus licheniformis*
and Preliminary Studies on Its Flocculation Genes

王娜

指导教师姓名: 何宁 教授
专 业 名 称: 生 物 化 工
论文提交日期: 2012 年 06 月
论文答辩时间: 2012 年 06 月
学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

2012 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

絮凝剂是一类可使液体中不易沉降的悬浮颗粒物聚集、沉降的物质，在废水处理、发酵工业、食品加工等行业广泛应用，可以分为无机絮凝剂和有机絮凝剂两大类。其中，生物絮凝剂是一类由微生物产生的具有絮凝作用的高分子有机物，可生物降解，具有广阔的应用前景。

以筛选到的一株具有高絮凝活性的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) CGMCC 2876 为实验菌株，构建 Fosmid 文库，尝试对该株细菌絮凝基因进行探索。结果表明，*B. licheniformis* CGMCC 2876 Fosmid 文库构建成功，共获得 1824 个重组克隆，重组克隆可以稳定遗传，外源插入片段在 25-40 kb 之间。应用两步建池策略，构建了超级池、初级池和二级池，以生物絮凝剂对高岭土悬浮液的絮凝作用为标准，快速筛选具有絮凝活性的阳性克隆。最终得到 4 株阳性克隆，定位于第 17 号板池 (Pool B, Pool 4) (Pool D, Pool 5) (Pool D, Pool 7) (Pool G, Pool 10)。

对其中的部分阳性克隆进行全长测序并进行序列分析。Softberry 软件及 BLAST 程序分析该插入片段约 29 kb，含有 24 个推测的开放阅读框。对推定基因编码的产物进行注释，基因编码的产物大部分为参与多糖类物质合成的酶或蛋白，包括磷酸转移酶、ABC 转运蛋白、糖苷水解酶、半乳糖通透酶、甘露糖转移酶、糖基转移酶家族蛋白、UDP-葡萄糖-4-差向异构酶等催化生物反应的一系列酶。同时获得编码未知功能蛋白的基因。蛋白亚细胞定位预测 13 种产物为膜蛋白，3 种蛋白定位于胞外，其他为细胞质基质蛋白质，预测该片段含 13 个启动子、13 个终止子及 5 个操纵子。推测该片段的某些开放阅读框可能与合成地衣芽孢杆菌胞外多糖类絮凝剂有关。另外，分析插入片段的酶切位点，尝试酶切缩小插入片段构建亚克隆。该结果为进一步研究地衣芽孢杆菌基因组结构功能及细菌絮凝基因奠定了基础。

关键词：生物絮凝剂；地衣芽孢杆菌；Fosmid 文库；絮凝基因

Abstract

Flocculant, as a type of efficient water treatment agent, can induce the solid particles, cells, and colloidal particles in a liquid suspension to flocculate and subside. Because of its relevance for the industrial processes, such as tap water producing, fermentation, and food industries, flocculant has been the subject of the significant scientific and biotechnological interest. In general, flocculant can be classified into inorganic flocculant and organic flocculant. Bioflocculant is a kind of organic polymer that produced by microorganism. Because of the biodegradability, bioflocculant has been receiving more and more concerns nowadays.

In this study, we tried to explore genes involved in the bioflocculant biosynthesis of *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876. A Fosmid library from the bacterium was constructed successfully and total 1824 recombinant clones were obtained. The recombinant clones with inserted fragments, 25-40 kb in size, were genetically stable. The two pooling scheme was used to construct the super pool, the primary pools, and the secondly pools. The expression-based approach that was based on determination of the flocculating activity was used to select the positive fosmid clones. Four desired clones were localized in the 17th pool with (Pool B, Pool 4) (Pool D, Pool 5) (Pool D, Pool 7) (Pool G, Pool 10).

Sequence analysis of the inserted fragment revealed a 29-kb region encoding 24 open reading frames. The gene products, including the components of phosphotransferase system, the components of ATP-binding cassette transporter, glycosyltransferase, epimerases, dehydratases, several proteins with unknown functions, etc., showed genetic homology with genes annotated in the genomes of other strains. Identification of the subcellular localization was performed with the software. The proteins were located in cytoplasmic membrane, out of cell, or in cytoplasm, separately. There are 13 putative promoters and terminators as well as 5 putative operons. It is of note that several genes coding for polysaccharide are present in the genes, which could be correlated with the high percentage of polysaccharide detected in the bioflocculant.

Randomly digested the inserted fragment DNA by enzyme for subclone was also carried out. The results lay a foundation for the further study of genes encoding bioflocculant and the whole genomic structure and function of *Bacillus licheniformis*.

Key words: bioflocculant; *Bacillus licheniformis*; Fosmid library; flocculation gene

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

第一章 绪论	1
1.1 生物絮凝剂	1
1.1.1 絮凝剂与生物絮凝剂.....	1
1.1.2 生物絮凝剂种类及活性成分.....	3
1.1.3 生物絮凝剂的应用.....	4
1.1.4 生物絮凝剂发展方向.....	5
1.2 微生物絮凝基因的研究	6
1.2.1 酵母絮凝基因的研究.....	6
1.2.2 细菌絮凝基因的研究.....	11
1.3 基因组文库在微生物研究中的应用.....	11
1.3.1 基因组文库.....	11
1.3.2 构建基因组文库的载体.....	12
1.3.3 大片段基因组文库的应用.....	17
1.4 本论文的主要研究内容及意义.....	19
第二章 地衣芽孢杆菌 CGMCC 2876 Fosmid 文库构建.....	20
2.1 实验材料和仪器	20
2.1.1 实验材料与试剂.....	20
2.1.2 实验仪器.....	21
2.1.3 菌种.....	21
2.1.4 培养基.....	21
2.2 实验方法	21
2.2.1 提取地衣芽孢杆菌基因组总 DNA.....	21
2.2.2 地衣芽孢杆菌 Fosmid 文库构建	23
2.2.3 文库质量鉴定.....	26
2.2.4 文库保存.....	28
2.3 结果与讨论	29

2.3.1 地衣芽孢杆菌基因组总 DNA 的提取.....	29
2.3.2 目的 DNA 片段的回收.....	30
2.3.3 Fosmid Clones 包装滴度的测定	31
2.3.4 检测插入片段.....	32
2.3.5 重组质粒稳定性检测.....	32
2.3.6 计算文库的覆盖倍数.....	33
2.4 小结	33
第三章 地衣芽孢杆菌 CGMCC 2876 Fosmid 文库分析.....	34
3.1 实验材料与仪器	34
3.1.1 实验材料与试剂.....	34
3.1.2 实验仪器.....	34
3.1.3 菌种来源.....	34
3.1.4 培养基.....	34
3.2 实验方法	35
3.2.1 培养方法.....	35
3.2.2 建池及筛选.....	35
3.2.3 絮凝活性测定方法.....	36
3.2.4 Fosmid 阳性单克隆高拷贝诱导.....	37
3.2.5 阳性克隆 Fosmid DNA 提取.....	37
3.2.6 阳性克隆末端测序和全长测序.....	38
3.2.7 阳性克隆序列分析.....	39
3.3 结果与讨论	39
3.3.1 阳性克隆筛选.....	39
3.3.2 阳性克隆酶切检测.....	43
3.3.3 阳性克隆末端序列分析.....	44
3.3.4 阳性克隆全长序列分析.....	45
3.4 小结	53
第四章 地衣芽孢杆菌 CGMCC 2876 絮凝基因亚克隆构建	55

4.1 实验材料与仪器	55
4.1.1 实验试剂.....	55
4.1.2 实验仪器.....	55
4.1.3 菌种.....	55
4.1.4 培养基.....	55
4.2 实验方法	55
4.2.1 Fosmid 单克隆高拷贝诱导及 DNA 提取.....	55
4.2.2 Fosmid 阳性克隆-亚克隆构建	56
4.2.3 絮凝活性阳性克隆的筛选.....	60
4.3 结果与讨论	60
4.3.1 亚克隆构建.....	60
4.3.2 絮凝活性阳性克隆的筛选.....	62
4.4 小结	62
第五章 结论与展望	64
5.1 结论	64
5.2 展望	65
参考文献	66
附 录	77
在读期间的科研成果	81
致 谢	82

Table of Contents

Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Biofloculant	1
1.1.1 Flocculant and biofloculant.....	1
1.1.2 Types of biofloculant.....	3
1.1.3 Application of biofloculant	4
1.1.4 Development trends of biofloculant.....	6
1.2 Researches on flocculation genes of microorganisms.....	6
1.2.1 Flocculation genes of yeast.....	6
1.2.2 Flocculation genes of bacteria	11
1.3 Researches on the genomic library in microbiology.....	11
1.3.1 Genomic library	11
1.3.2 Development of the vectors	12
1.3.3 Application of the genomic library	17
1.4 Main contents and significance of this thesis	19
Chapter 2 Construction the Fosmid library of <i>Bacillus licheniformis</i>	
CGMCC 2876.....	20
2.1 Materials and equipment	20
2.1.1 Materials and reagents	20
2.2.2 Equipment.....	21
2.2.3 Strain	21
2.2.4 Media	21
2.2 Methods	21
2.2.1 Preparation of the genomic DNA	21
2.2.2 Construction of the Fosmid library	23
2.2.3 Confirmation the quality of Fosmid library	26
2.2.4 Preservation of the Fosmid library.....	28

2.3 Results and discussion.....	29
2.3.1 Preparation of the genomic DNA	29
2.3.2 Recovery of the size- fractionated DNA.....	30
2.3.3 Titer of the packaged CopyControl Fosmid Clones.....	31
2.3.4 Detection of the inserted fragment.....	32
2.3.5 Stability test of the fosmid library	32
2.3.6 Calculation of the covering multiples	33
2.4 Summary	33
Chapter 3 Analysis of the Fosmid library of <i>Bacillus licheniformis</i>	
CGMCC 2876.....	34
3.1 Materials and equipment.....	34
3.1.1 Materials and reagents	34
3.1.2 Equipment.....	34
3.1.3 Strain	34
3.1.4 Media	35
3.2 Methods	35
3.2.1 Cultivation of the strain	35
3.2.2 Pooling and screening.....	35
3.2.3 Determination of the flocculating activity	36
3.2.4 Induction of the positive clones to high-copy number.....	37
3.2.5 Extraction of the fosmid DNA.....	37
3.2.6 Sequencing the positive clones	38
3.2.7 Analysis of the sequences	39
3.3 Results and discussion.....	39
3.3.1 Screening the positive clones.....	39
3.3.2 Enzyme digestion.....	43
3.3.3 Analysis of the end sequences.....	44
3.3.4 Analysis of the full-length sequences	45
3.4 summary.....	53

Chapter 4 Subclone of flocculation genes from <i>Bacillus licheniformis</i> CGMCC 2876	55
4.1 Materials and equipment	55
4.1.1 Materials and reagents	55
4.1.2 Equipment	55
4.1.3 Strain	55
4.1.4 Media	55
4.2 Methods	55
4.2.1 Extraction of the fosmid DNA	55
4.2.2 Construction of subclone	56
4.2.3 Enzyme digestion of the recombination clones	60
4.3 Results and discussion	60
4.3.1 Construction and analysis of the subclone	60
4.3.2 Screening of the positive clones	62
4.4 Summary	62
Chapter 5 Conclusions and prospect	64
5.1 Conclusions	64
5.2 Propect	65
References	66
Appendices	77
Publications and patents	81
Acknowledgements	82

第一章 绪论

1.1 生物絮凝剂

1.1.1 絮凝剂与生物絮凝剂

近年来，随着社会经济的发展，工农业用水需求量的激增、水资源浪费以及水资源污染问题日趋严重。无论是民用水，还是工业用水都需要经过处理才能使用。目前，国内外绝大多数的厂家都采用絮凝沉淀法进行水处理。向水中加入絮凝剂，使水中的胶体和悬浮物絮凝成较大的絮凝体，便于分离，达到水质净化的目的。絮凝剂是用来将水溶液中的溶质、胶体或者悬浮物颗粒产生絮凝状物沉淀的物质。絮凝剂在用水与废水处理和生产过程的固液分离中占有重要地位，是应用最广、成本最低、最常用的处理方法^[1, 2]。

根据絮凝剂的组成，将其可分为无机絮凝剂和有机絮凝剂两类。其中无机絮凝剂又包括无机低分子絮凝剂和无机高分子絮凝剂；有机絮凝剂又包括人工合成有机高分子絮凝剂、天然有机高分子絮凝剂。微生物絮凝剂是天然有机高分子絮凝剂的一类，表 1.1 是絮凝剂分类与性能比较^[1]。

表 1.1 絮凝剂分类与性能比较

Table 1.1 Classifications and comparisons of the present main flocculant

絮凝剂分类	常用种类	优点	缺点
无机絮凝剂	无机低分子絮凝剂 三氯化铝、硫酸铝、氧化钙、氢氧化钙	产量大、价格低、絮凝效果好	残留毒性、非生物可降解性、影响水质
	无机高分子絮凝剂 聚合氯化铝、聚合硫酸铝、聚合氯化铁、聚合硫酸铁		
有机絮凝剂	人工合成有机高分子絮凝剂 聚丙烯酰胺及其衍生物、聚丙烯酸钠	价格低、用量少、絮凝效果好、适用范围广、无毒、可生物降解	残留毒性、非生物可降解性
	天然高分子絮凝剂 纤维素、多糖、淀粉、果胶、蛋白质		絮凝效果弱、成本高

无机絮凝剂，主要有铁盐和铝盐及其一些多聚物。其中硫酸铝是世界给水和废水处理中使用最早、最多的絮凝剂，自19世纪末美国首先将硫酸铝用于给水处理以来，一直被广泛采用。70年代中期，铁系无机高分子絮凝剂聚合硫酸铁(PFS)问世，对高浊度废水处理效果显著。80年代末，新型絮凝剂碱式硅酸硫酸铝

(PASS)问世，它是一种碱式多核羟基硫酸铝复合物，有较多的活性铝，能生成高密度的絮状物，沉降迅速，在冷水温度下(10℃)效力不变^[3]。近几年，高分子无机絮凝剂发展迅速，聚合氯化铝(PAC)、聚合硫酸铝(PAS)和聚合硫酸铁(PFS)都有定型产品，聚合氯化铁尚处于开发阶段。虽然无机高分子絮凝剂对各种复杂成分的水处理适用性强，但是铝盐具有毒性，会影响人体健康，铁盐会造成处理水中带颜色，高浓度的铁也会对人类健康和生态环境产生不利影响^[4]。复合型高分子无机絮凝剂的开发已形成明显的发展趋势。

与先进国家相比，我国有机絮凝剂在产量、品种、质量及应用等方面均存在很多差距。我国从20世纪60年代以来开始研究和应用无机及有机高分子絮凝剂。目前广泛应用于水处理的絮凝剂主要有无机高分子絮凝剂和有机高分子絮凝剂。如聚丙烯酰胺应用于化工、冶金、造纸等行业，主要用于污泥脱水，少部分用于废水澄清。与无机絮凝剂相比，合成有机高分子絮凝剂用量少，絮凝速度快，受共存盐类、介质pH值及环境温度影响小，生成污泥量少，而且有机高分子絮凝剂分子因带羧基、羟基、氨基等亲电基团，可形成链状、环状多种结构，脱色性能较无机絮凝剂高。但是合成高分子絮凝剂其单体或水解、降解产物常常有毒，如聚丙烯酰胺的单体。因此，合成高分子絮凝剂不能用来处理引用水，只能用来处理废水^[3]。天然高分子改性絮凝剂包括糖浆、纤维素、含胶植物、多糖类和蛋白质等类别的衍生物，目前产量约占有机高分子絮凝剂总量的20%。

微生物絮凝剂是天然有机高分子絮凝剂的一类，主要包括从微生物细胞壁提取物、利用微生物代谢产物和直接利用微生物细胞等形式的絮凝剂，可使液体中不易降解的固体悬浮颗粒、菌体细胞及胶体粒子等凝集、沉淀^[5]。与传统絮凝剂相比，生物絮凝剂有独特的优点：无二次污染，降解安全可靠。目前使用的传统絮凝剂如铝盐、铁盐及其聚合物、聚丙烯酰胺衍生物等，经过絮凝之后形成的废渣，不能或难于被生物降解，严重污染水体、土壤，造成二次污染。生物絮凝剂主要成分是多聚糖、多肽和蛋白质等，易被微生物降解，不会影响水处理效果，

且絮凝后的残渣可被生物降解,对环境无害。因此,生物絮凝剂不仅可以应用于水处理领域,而且适用于食品发酵、生物制药等方面。同时,生物絮凝剂易于实现固液分离,形成沉淀物少。生物絮凝剂作为一种高效安全絮凝剂,得到了诸多研究者的重视和认可。

1.1.2 生物絮凝剂种类及活性成分

微生物絮凝现象最早发现于酿造工业中。1876 年, Pasteur 发现发酵后期的酵母菌 *Levure casseeuse* 具有絮凝能力。1899 年, Bordet 在细菌培养中也观察到从血液中分离出的抗体可以凝集细菌细胞。Butterfield 于 1935 年从活性污泥中筛选得到具有一定絮凝活性的菌胶团,这是在水处理领域 and 环境保护领域应用中,最早发现的具有分泌絮凝剂能力的微生物^[6, 7]。20 世纪 70 年代,美国研究者发现相生枝动胶菌 (*Zoolea ramigera*) 有着良好的絮凝活性,其在生长过程中能产生出聚合纤维素纤丝,且存在荚膜^[8]。1975 年, Nakamura 等人从包括霉菌、细菌、放线菌和酵母菌者在内的 214 株菌株中,分离筛出 19 株絮凝剂产生菌,其中以酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*) 产生的絮凝剂 AJ7002 效果最好^[9]。1986 年,日本学者分离筛选到红平红球菌 (*Rodococcus erythropolis*),并将菌株产生的微生物絮凝剂命名为 NOC-1^[10, 11]。此后,各种产生物絮凝剂的微生物被分离筛选出。产生絮凝剂的微生物绝大多数来自与人类关系十分密切的土壤中,资源极其丰富,且获取简便。研究表明,能够产生絮凝物质的微生物种类繁多,包括细菌、放线菌、酵母菌及霉菌,其中国内外研究报道较多的产生物絮凝剂的微生物是霉菌与酵母菌^[12-14]。

产生物絮凝剂的微生物众多,不同微生物在特定条件下产生的絮凝剂性质、结构有所不同,生物絮凝剂种类繁多。已报道的微生物产生的絮凝物质为多糖、蛋白质、纤维素等高分子化合物,另外还有少量属于脂类和 DNA 等其它类型。

目前已经鉴定的生物絮凝剂有很多种属于多糖类物质。协腹产碱杆菌 (*Alcaligenes cupidus*) KT201 代谢产生的 Al-201 即是一种多聚糖絮凝剂,分子量超过 2×10^6 ,含 42.5 % 的葡萄糖、36.38 % 的半乳糖、8.52 % 的葡糖醛酸和 10.3 % 的乙酸^[15]。*Paecilomyces* sp. I-1 产生的 PF-101 絮凝剂是由氨基半乳糖以 α -1, 4 糖苷键相连而成的粘多糖,其中含有约 80% 半乳糖胺 8% 乙酰化的半乳糖胺^[16]。纤维素作为一种多糖物质,也是某些生物絮凝剂的主要活性组分。*Rhizobium*

trifolii NA30 产生的絮凝剂主要成分为纤维素^[17]。日本学者 Takeda 等研究者对 *R. erythropolis* 分泌的絮凝剂 NOC-1 进行了分离纯化,发现 NOC-1 的主要成分是蛋白质,而且分子中含有较多的疏水氨基酸包括丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸和天冬氨酸等等,其最大相对分子质量为 75 万^[18]。*Aspergillus sojae* AJ7002 合成的絮凝剂含 20.9%的半乳糖胺、0.3%的葡萄糖胺、35.3%的 2-酮葡萄糖酸与 27.5%的蛋白质,半乳糖胺和葡萄糖胺均非乙酰化,其主要活性成分是蛋白质和己糖胺^[19]。多肽类生物絮凝剂 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)是一种可由微生物合成的氨基酸聚合物,具有较强的絮凝活性^[20]。研究发现编码 γ -聚谷氨酸生物合成的操纵子,包括 *ywsC*、*ywtA*、*ywtB*、*ywtC* 和 *ywtD* 5 个基因,*ywtD* 位于 *ywsC* 和 *ywtABC* 的下游^[21, 22]。1994 年 Kurane 从 *R. erythropolis* S-1 的培养液中分离到了一种脂类絮凝剂,这是目前发现的唯一的脂类絮凝剂,含有葡萄糖单霉菌酸酯(GM)、海藻糖单霉菌酸酯(TM)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)三种组分,霉菌酸碳链长度从 C32 到 C40 不等,其中以 C34、C36 和 C38 居多^[23, 24]。Sakka 等研究人员于 1981 年从活性污泥中筛选得到菌株 *Pseudomonas* sp. C-120,该菌产生的絮凝物质是相对分子量大于 2×10^6 的 DNA,在钠离子的存在下,经 DNAase 处理产生解絮凝现象^[25]。

1.1.3 生物絮凝剂的应用

生物絮凝剂作为一类新型絮凝剂,其高效的絮凝活性、可生物降解性及应用安全性显示了它在水处理、食品加工和发酵工业等方面的应用前景。在国外,生物絮凝剂的商业化生产始于 20 世纪 90 年代,因其不存在二次污染、使用安全方便,应用前景诱人。国内学者也已经注意生物絮凝剂的优异性能,提出了微生物絮凝剂将大部分或全部替代普通絮凝剂。在水处理方面,生物絮凝剂主要用于废水脱色,去除悬浮颗粒及重金属离子,COD、BOD 及总有机碳(TOC)和总氮(TN),还可以处理膨胀活性污泥和促进乳化液油水分离。

国内的研究人员利用分离筛选得到的絮凝性微生物进行研究。硅酸盐芽孢杆菌产生的絮凝剂 MBFA9 处理河水,用量少,降低了处理费用,沉降 30 min 后,浊度为 0.8 NTU,处理后的上清液更加清澈,絮凝效果优于 HPAM^[26]。产絮凝剂菌株 GS7 用于城市污水、餐饮废水和医院废水除浊的实验中,投药 5 min 即可形成大絮团,30 min 后水质清澈透明,浊度去除率达 93.5%^[27]。生物絮凝剂与化学絮凝剂复配而成的复合型絮凝剂对松花江水的 COD 去除率达到 91.2%^[28]。生物

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库